

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) DD 287 951 A5

5(51) C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

in der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 720 7	(22)	15.09.85	(44)	14.03.91
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate				

(55) Verfahren; Immobilisierung; Polyoxyalkylenglykole; mit Chlorameisensäureestern aktivierte Polymere; biologisch aktive Verbindungen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate, einschließlich ihrer thiolgruppenhaltigen Derivate, werden als ihre mit Chlorameisensäureestern aktivierten Ester mit biologisch aktiven Verbindungen umgesetzt, die nukleophile Gruppen besitzen. Die Reaktionen werden in wässrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen dieser Lösungsmittel miteinander und untereinander bei 0°C bis 150°C in Gegenwart von Puffersubstanzen oder säurebindenden Mitteln durchgeführt. Die erfindungsgemäßen Immobilisate besitzen ein breites Anwendungsspektrum in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß biologisch aktive Verbindungen mit durch Chloramelsäureester aktivierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre ebenso aktivierten Monoalkoxyderivate sowie ihre thiolgruppenhaltigen Analoga in wäßrigen Lösungen oder organischen Lösungsmitteln oder Gemischen dieser miteinander und untereinander im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C, gegebenenfalls in Gegenwart von Puffersubstanzen oder säurebindenden Mitteln, umgesetzt werden und die mit Polyoxyalkylenglykolen oder ihren Monoalkoxyderivaten modifizierten, biologisch aktiven Verbindungen aus den Reaktionslösungen nach an sich bekannten Verfahren isoliert und gereinigt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch aktive Verbindungen Biokatalysatoren wie Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme und Koenzyme oder biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine, zuckerbindende Proteine oder in vitro hergestellte Konjugate aus Biokatalysatoren und biokatalytisch inaktiven Proteinen oder nieder- und hochmolekulare Effektoren wie Nukleinsäuren, Bruchstücke von Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka, Sauerstoff bindende, aktivierende und transportierende, synthetische Verbindungen sowie Affinitätsliganden eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5 bis 12 bei 0°C bis 30°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden ausgeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C in Gegenwart säurebindender Mittel im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden erfolgen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel in Gegenwart eines säurebindenden Mittels bei 0°C bis 100°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 8 Stunden erfolgen.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel tertiäre Amine, Heterocyklen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Biokatalysatoren Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Das Verfahren kann in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Biologisch aktive Verbindungen wie Biokatalysatoren, biokatalytisch inaktive Proteine oder Pharmaka, die kovalent an lösliche oder unlösliche Trägermaterialien gebunden wurden, werden bereits in großem Umfange praktisch genutzt.

Stoffwandlungsreaktionen durch biotechnologische Verfahren und auch Proteinreinigungsmethoden – auch solche im vergrößerten Maßstab – werden heute in vielen Fällen unter Einsatz unlöslich und damit wiederverwendbar gemachte, biologisch aktiver Verbindungen durchgeführt.

Aber auch synthetische Makromoleküle wie Dextrane, Polyaminosäuren, Polyvinylalkohol oder Polyoxyalkylenglykole, die in wäßrigen Systemen löslich sind, finden zunehmend Interesse und auch Anwendung in der Biotechnologie und Medizin.

Koenzyme mit einem Adeninringsystem werden zum Beispiel an Typen der genannten, wasserlöslichen Polymeren kovalent gebunden und als solche Makromoleküle in biochemischen Reaktionen angewendet (BRD-Auslegeschrift 2841414). Aber auch Proteine – sowohl biokatalytisch aktive als auch biokatalytisch inaktive – wurden schon an wasserlösliche Polymere gebunden (Trends Biotechnol., 1986, 4, 68–73), und die Immobilisate wurden auf ihre Anwendung hin geprüft.

Eine besondere Rolle bei der Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an wasserlösliche Polymere spielen Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Dies ist darin begründet, daß diese Polymere sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Mit Vorteil können diese Polymeren damit auch in den genannten Lösungsmitteln modifiziert werden zu Polymeren mit anderen funktionellen Gruppen als den Hydroxylgruppen, die in den Grundpolymeren vorliegen. Von besonderer Bedeutung ist dabei aber auch, daß diese Polymeren zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen in organischen Lösungsmitteln unter wasserfreien Bedingungen aktiviert werden können und damit weitaus mehr Aktivierungsmethoden der Polymeren zur Verfügung stehen, als für Polymere, die in organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind, sondern nur in wäßrigen Systemen. Für die Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate sind solche Aktivierungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln beschrieben, zum Beispiel mit Cyanurchlorid als Aktivierungsmittel. Diese Aktivierungsmethode für hydroxylgruppenhaltige Polymere ist aber auf Grund der hohen Toxizität des Cyanurchlorids und seiner Substitutionsprodukte für Anwendungen von mit Cyanurchlorid aktivierten Polymeren in der Lebensmittelindustrie und auch Medizin als bedenklich einzuschätzen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein neues Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykol und ihre Monoalkoxyderivate zu erarbeiten, daß nichttoxische beziehungsweise wenig toxische Aktivierungsmittel verwendet und stabile Immobilisate ergibt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen zu erarbeiten, bei denen diese an mit nichttoxischen oder wenig toxischen Aktivierungsmitteln aktivierten, hydroxylgruppenhaltigen oder thiolgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykolen oder ihren ebenso substituierten Monoalkoxyderivaten kovalent gebunden werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die biologisch aktiven Verbindungen mit geeigneten, durch Chlorameisensäureester aktivierte Polymere mit Hydroxylgruppen oder Thiolgruppen vom Typ der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, in wäßrigen Lösungen oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen aus wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln im Zeitraum von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Reaktionstemperaturen von 0°C bis 150°C, gegebenenfalls in Gegenwart von Puffersubstanzen oder anderen säurebindenden Mitteln umgesetzt werden. Als aktivierte Polymere werden vorzugsweise mit Chlorameisensäure-N-hydroxysuccinimidester, Chlorameisensäure-1-hydroxybenzotriazolester oder N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktivierte, hydroxylgruppenhaltige oder thiolgruppenhaltige Polyoxyalkylenglykole oder mit den gleichen Aktivierungsgruppen substituierte Monoalkoxyderivate dieser Polymeren eingesetzt. Für die erfindungsgemäßen Immobilisierungsreaktionen kommen aber auch andere Chlorameisensäureester in Frage, zum Beispiel mit Chlorameisensäure-p-nitrophenylester oder Chlorameisensäure-2,4,6-trichlorphenylester aktivierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre Monoalkoxyderivate und ihre thiolgruppenhaltigen Analoga, vor allem dann, wenn die Immobilisate außerhalb der Medizin und Nahrungsmittelindustrie verwendet werden sollen.

Als biologisch aktive Verbindungen können eine Vielzahl nieder- und hochmolekulare Verbindungen eingesetzt werden. Weitere Voraussetzung für das Gelingen der Immobilisierungsreaktionen, neben ihrer biologischen Aktivität, ist lediglich das Vorliegen funktioneller Gruppen mit nukleophilen Eigenschaften. Solche biologisch aktiven Verbindungen sind unter anderem Blockkatalysatoren wie Enzyme, vorzugsweise aus den Klassen der Hydrolasen, Oxidoreduktasen, Transferasen und Isomerasen Mikroorganismen oder Zellen, beziehungsweise blockkatalytisch inaktive Proteine wie Antikörper, Antigene, Hemoproteine, Albumine und andere oder niedermolekulare Verbindungen wie verschiedene Hormone, Vitamine, Koenzyme, Pharmaka, Synzyme und Affinitätsliganden, wie sie zum Beispiel in der Affinitätschromatographie benutzt werden. Da sich die mit Chlorameisensäureestern aktivierten Polymeren durch eine hohe Reaktivität auszeichnen, werden erfindungsgemäß auch instabile, biologisch aktive Verbindungen an diesen Polymeren immobilisiert, da die Anwendung auch milder Reaktionsbedingungen wie niedrige Reaktionstemperaturen oder kurze Reaktionszeiten zu Immobilisaten mit hoher biologischer Aktivität führt.

In Abhängigkeit von der Stabilität und Löslichkeit der biologisch aktiven Verbindungen – die aktivierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate sind sowohl in wäßrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich – werden die Immobilisierungsreaktionen unter den verschiedenartigsten Reaktionsbedingungen ausgeführt. Eine Möglichkeit besteht darin, daß in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5 bis 12, vorzugsweise von 7 bis 9, bei 0°C bis 30°C gearbeitet wird und die Reaktionszeit in diesen Fällen 1 Stunde bis 12 Stunden beträgt. Weiterhin werden die Immobilisierungsreaktionen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C bei Reaktionszeiten von 1 Stunde bis 12 Stunden und in diesen Fällen vorwiegend in Gegenwart eines säurebindenden Mittels durchgeführt. Eine weitere erfindungsgemäße Immobilisierungsvariante ist dadurch gekennzeichnet, daß Blockkatalysatoren und hierbei bevorzugt Enzyme, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel in Anwesenheit säurebindender Mittel bei 0°C bis 100°C im Verlauf von 1 Stunde bis 8 Stunden mit den aktivierten Polymeren umgesetzt werden.

Für die Bindung der bei den Immobilisierungsreaktionen freigesetzten Mineralsäure werden neben Puffersystemen auch andere säurebindenden Verbindungen verwendet. Dazu gehören zum Beispiel tertiäre Amine, Heterocyklen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate der Alkalisalze kondensierter Aromaten der Heteroaromaten.

Die Isolierung der an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate immobilisierten, biologisch aktiven Verbindungen ist nach verschiedenen Methoden möglich. Eine Möglichkeit besteht in der Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisierung der Reaktionslösungen. Eine andere Möglichkeit im Ausfällen mit organischen Lösungsmitteln der anorganischen Salzen, anschließend nach Dialyse der Reaktionslösungen. Und schließlich können die Immobilisate, nachdem die Reaktionslösungen mit einer ausreichenden Menge Wasser versetzt wurden, zunächst mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln extrahiert werden und aus der organischen Phase durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel oder Einengen derselben und Versetzen der restlichen Lösungen mit Ether oder Petrolether durch Ausfällung isoliert werden. Bei besonderen Reinheitsanforderungen werden die Immobilisate mit Hilfe chromatographischer Methoden weiter gereinigt.

Nach dem erfindungsgemäßen Immobilisierungsverfahren werden eine Vielzahl stabiler und neuer Immobilisate von biologisch aktiven Verbindungen mit Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten synthetisiert. Auf Grund der großen Reaktivität der mit Chloramelsäureestern aktivierten Polymeren sind die Umsetzungen unter milden Reaktionsbedingungen möglich, die zu Immobilisaten führen, die in der Medizin und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden können. Weitere Einsatzgebiete für die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslichen Polymeren sind die Biotechnologie, Chemie und Pharmazie.

Die Erfindung wird durch Beispiele weiter erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

10 mg Penicillinacylase werden in 15 ml eines 0,1 molaren Boratpuffers vom pH-Wert 8,0 gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,4 g mit N-(Chlorkarboxyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) in fester Form addiert bei einer Temperatur von 4°C. Die anfängliche Suspension und spätere Lösung wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 3 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Lösung wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, eine Ultrafiltration unterworfen, und die restliche Lösung wird lyophilisiert.

Ausbeute: 32 mg

Beispiel 2

0,6 g mit N-(Chlorkarboxyloxy)-succinimid aktiviertes w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 25 ml trockenem Benzen gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,5 g Imidazol und 20 mg Lipase aus *Rhizopus arrhizus* addiert. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 60°C gerührt, danach filtriert und das Benzen im Vakuum bei Umgebungstemperatur abdestilliert. Der Rückstand wird in 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 aufgenommen, die Lösung wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, ultrafiltriert und der Rest der Lösung wird lyophilisiert. Der Rückstand wird gelchromatographisch mit Sephadex G200 weiter aufgereinigt, wobei eine biokatalytisch aktive Fraktion erhalten wird.

Ausbeute: 43 mg

Beispiel 3

1 g mit N-(Chlorkarboxyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Monomethoxy-polyethylenglykol (MG 5000) wird in 15 ml destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. Zu dieser Lösung werden bei 4°C 50 mg in 50 ml 0,2 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 8,0 aufgelöstes Hemoglobin addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 3 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird die Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert, ultrafiltriert, und lyophilisiert. Eine weitere Reinigung des modifizierten Hemoglobins erfolgt durch Gelchromatographie an einer Säule, die mit Sephadex G25 gefüllt ist.

Ausbeute: 220 mg

Beispiel 4

1 g mit N-(Chlorkarboxyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Monomethoxy-polyethylenglykol (MG 5000) wird in 15 ml destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. Bei 4°C werden 50 mg in 25 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 suspendierte Zellen vom Mikroorganismus *Trichosporon cutaneum* addiert. Die Suspension wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 6 Stunden bei dieser Temperatur vorsichtig bewegt. Danach werden die modifizierten Zellen abfiltriert, mit obigem Phosphatpuffer gewaschen und bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert.

Beispiel 5

0,3 g Eisen(III)-protoporphyrin IX und 0,8 g Histamin werden in 15 ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wird 1 g mit 1-Chlorkarboxyloxy-4-nitrobenzen aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) in fester Form addiert. Die Lösung wird 3 Stunden bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen in 100 ml destilliertes Wasser eingetragen. Nach dem Filtrieren wird die Lösung dreimal mit jeweils 20 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und auf etwa 10 ml eingeeengt. Dieser Rest wird mit 100 ml Petrolether versetzt, und der ausgefallene Niederschlag wird gesammelt und bei Umgebungstemperatur getrocknet.

Ausbeute: 520 mg

Beispiel 6

Es werden 0,1 g des Koenzyms NAD⁺ in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Dazu werden 5 ml Acetonitril langsam zutropft, in dem 500 mg mit N-(Chlorkarboxyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) aufgelöst waren.

Unter pH-Kontrolle, der pH-Wert der Lösung sollte durch Zutropfen von geringen Mengen 0,01 n-er Natronlauge im Bereich von pH-Wert 4 bis pH-Wert 5 gehalten werden, wird die Lösung 3 Stunden bei 20°C bis 30°C gerührt. Die Lösung wird anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert und mit Natriumhydrogencarbonat versetzt, so daß sie einen pH-Wert von 8,0 erreicht. Danach werden 2 g Natriumdithionit zur Lösung addiert und das modifizierte K-Enzym wird innerhalb 20 Minuten bei 50°C reduziert. Die Lösung wird erneut gegen destilliertes Wasser dialysiert, danach auf pH-Wert zwischen 10 und 11 gebracht und 60 Minuten auf 60°C bis 70°C erhitzt. Die Lösung wird abgekühlt, gegen eine 0,01 molar Kalliumchloridlösung von pH-Wert 8,0 dialysiert, ultrafiltriert und lyophilisiert.

Ausbeute: 185 g



1/3,AB,LS/2 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008726948

WPI Acc No: 1991-230963/ 199132

XRAM Acc No: C91-100482

Immobilising biologically active cpds. - by reacting with polyoxyalkylene
activated as chloroformate ester giving prods of high stability

Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DEAK); ZENT MOLEKULAR AG
(MOLE-N)

Inventor: KUHN M

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 287951	A	19910314	DD 332720	A	19890915	199132 B

Priority Applications (No Type Date): DD 332720 A 19890915

Abstract (Basic): DD 287951 A

Biologically active cpds. (I) are immobilised by reacting them with
a chloroformate ester-activated polyoxyalkylene glycol (II), or its
monoalkoxy deriv. or their analogues contg. thio gps. for 0.5-12 hr at
0-150 deg.C, then the immobilised product A) is recovered and purified
conventionally. Reaction is in aq. soln., organic solvent or mixed
aq./organic system, opt. in presence of buffer or acid acceptor.

Specifically (I) is e.g, a (synthetic)enzyme; microorganism,
animal, plant or human cell; antigen, antibody, coagulation factor,
enzyme conjugate, nucleic acid, pharmaceutical, etc.

(II) is activated by reacting in aq. and/or organic solvent (opt.
in presence of buffer or acid binder) at 0-15 deg.C with e.g,
N-hydroxysuccinimide or 1-hydroxybenzotriazole chloroformate esters or
with N-(chlorocarbonyloxy) -5-norbornene-2,3 -dicarboximide (III).

USE/ADVANTAGE - (A) are useful in biotechnology, biochemistry,
pharmaceuticals and medicine. They can be prepd. without using highly
toxic activating agents (contrast use of cyanuric chloride); have
high stability and biological activity, and because of the high
reactivity of activated (II) can be prepd. under mild conditions. (5pp
Dwg.No.0/0)



1/3,AB,LS/1 (Item 1 from file: 345)
DIALOG(R)File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat
(c) 2002 EPO. All rts. reserv.

Acc no: 9707162

Basic Patent (No,Kind,Date): DD 287951 A5 910314

<No. of Patents: 001>

VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER VERBINDUNGEN AN
POLYOXYALKYLENGLYKOLE UND IHRE MONOALKOXYDERIVATE (German)

Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DE)

Author (Inventor): KUEHN MANFRED (DE)

IPC: *C12N-011/08;

CA Abstract No: 115(21)227838W

Derwent WPI Acc No: C 91-230963

Language of Document: German

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applic No	Kind	Date
DD 287951	A5	910314	DD 332720	A	890915 (BASIC)

GERMAN DEMOCRATIC REPUBLIC (DD)

Legal Status (No,Type,Date,Code,Text):

DD 287951	P	970605	DD ENJ	CEASED DUE TO NON-PAYMENT OF RENEWAL FEE (ERLOSCHEN DURCH NICHTZ. D. JAHRESGEB.)
-----------	---	--------	--------	--

Priority (No,Kind,Date): DD 332720 A 890915

No of Legal Status: 001

